

DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-1-59-65
УДК 615.072; 615.222; 547.587.51

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБСТАНЦИИ 4,4'-ДИМЕТИЛ-7,7'-ЭТИЛЕНДИОКСИ-2Н-1-ДИБЕНЗОПИРАН-2,2'-ДИОНА

К. Б. Нгуен^{1*}, А. З. Абышев¹

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

*Контактное лицо: Нгуен Конг Банг. E-mail: nguyencongbang.ru@gmail.com

Статья получена: 05.10.2018. Статья принята к печати: 11.01.2019

Резюме

Введение. Одной из наиболее перспективных синтетических соединений производных кумарина является иммунакор – 4,4'-диметил-7,7'-этилендиокси-2Н-1-добензопиран-2,2'-диона. В результате доклинических исследований показано, что перспективность его применения в медицинской практике в качестве иммуномодулятора для лечения и профилактики вторичных иммунодефицитных заболеваний.

Цель. Задача настоящей работы являются разработки методик ВЭЖХ и УФ-спектрофотометрии для определения количественного содержания субстанции иммунакора и изучение комплекса валидационных характеристик разработанной методики.

Материалы и методы. Для количественного анализа исследуемого вещества использовали методы УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ. Валидация методик была проведена по параметрам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность в соответствии с требованиями ГФ XIV.

Результаты и обсуждение. Определены валидационные характеристики и экспериментально подтверждено их соответствие необходимым критериям приемлемости.

Заключение. Разработаны методики количественного определения действующего вещества в фармацевтической субстанции 4,4'-диметил-7,7'-этилендиокси-2Н-1-добензопиран-2,2'-диона (иммунакора) методом ВЭЖХ и УФ-спектрофотометрии. Установлено, что разработанные методики являются правильными, прецизионными, специфичными и линейными в аналитической области. По воспроизводимости метод ВЭЖХ существенно превосходит метод УФ-спектрофотометрию.

Ключевые слова: иммунакор, кумарины, ВЭЖХ, УФ-спектрофотометрия, количественное определение, валидация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Нгуен К. Б., Абышев А. З. Валидация методик количественного определения субстанции 4,4'-диметил-7,7'-этилендиокси-2Н-1-добензопиран-2,2'-диона. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2019; 8(1): 59–65.

VALIDATION METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF 4,4'-DIMETHYL-7,7'-ETHYLENedioxy-2H-1-DIBENZOPYRAN-2,2'-DIONE SUBSTANCE

С. В. Nguyen^{1*}, А. Z. Abyshev¹

1 – Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., Saint-Petersbourg, 197376, Russia

*Corresponding author: Cong B. Nguyen. E-mail: nguyencongbang.ru@gmail.com

Received: 05.10.2018. Accepted: 11.01.2019

Abstract

Introduction. One of the most promising synthetic compounds of coumarin derivatives is immunacor-4,4'-dimethyl-7,7'-ethylenedioxy-2H-1-dibenzopyran-2,2'-dione. As a result of preclinical studies, it has been shown that it is promising in medical practice as an immunomodulator for the treatment and prevention of secondary immunodeficiency diseases.

Aim. The objective of this work is to develop methods for HPLC and UV spectrophotometry to determine the quantitative determination of the immunacor substance and to study the complex of validation characteristics of the developed methods.

Materials and methods. Quantitative analysis of the substance was carried out by UV-Spectrophotometry and HPLC. Validation procedures were performed on parameters: specificity, linearity, accuracy and precision in accordance with the requirements of FP XIV.

Results and discussion. Validation characteristics have been determined, and their compliance with the relevant eligibility criteria has been experimentally verified.

Conclusion. Methods for quantitative determination of the active component in 4,4'-dimethyl-7,7'-ethylenedioxy-2H-1-dibenzopyran-2,2'-dione (immunacor) pharmaceutical substance by HPLC and UV spectrophotometry has been developed. It is established that methods are specific, accurate, precise and linear in the analytical field. The precision HPLC method far exceeds the UV-spectrophotometry.

Keywords: immunacor, coumarins, HPLC, UV-spectrophotometry, quantitative determination, validation.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Nguyen C. B., Abyshev A. Z. Validation methods for quantitative determination of 4,4'-dimethyl-7,7'-ethylenedioxy-2h-1-dibenzopyran-2,2'-dione substance. *Drug development & registration.* 2019; 8(1): 59–65.

ВВЕДЕНИЕ

В процессе исследований физико-химических и фармакологических свойств многочисленных природных и синтетических гибридных производных кумарина (2Н-1-бензопиран-2-она) нами было показано, что данная группа веществ обладают достаточно широким спектром фармакологического действия, в том числе антиаритмической, иммуномодулирующей, противо-

вирусной, антигипоксантажной и антикоагулянтной активностями [1–3].

Одной из наиболее перспективных синтетических соединений является иммунакор – 4,4'-диметил-7,7'-этилендиокси-2Н-1-добензопиран-2,2'-диона, ранее впервые нами был синтезирован в производственном комплексе «Химия и технология лекарственных препаратов» Санкт-Петербургского НИИ вакцин и сывороток [4]. В результате доклинических исследований на-

ми показано, что перспективность его применения в медицинской практике в качестве иммуномодулятора для лечения и профилактики вторичных иммунодефицитных заболеваний достаточно очевидно [5].



В связи с тем, что данное соединение рекомендуется нами к клиническим испытаниям, необходимо подготовить соответствующих нормативных документов и образцов субстанции. Исходя из актуальности темы, целью настоящей работы являются разработки методик ВЭЖХ и УФ-спектрофотометрии для определения количественного содержания субстанции иммунакора и изучение комплекса валидационных характеристик разработанной методики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись образцы субстанции иммунакора, его стандартного образца, разработанные нами на кафедре фармацевтической химии ФГБОУ ВО СПХФУ.

Количественное определение методом ВЭЖХ:

Около 0,025 г (точная навеска) стандартного образца и субстанции помещают в отдельные мерные колбы вместимостью 50 мл, растворяют в 50 мл ДМФА (ОЧС, CAS № 75-05-8, Вектон, Россия) при нагревании, охлаждают и доводят объем раствора до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора переносят в отдельные мерные колбы вместимостью 50 мл, доводят объем раствора ацетонитрилом до метки и перемешивают. Хроматографируют испытуемый раствор и стандартный раствор и определяют площади пиков исследуемого образца.

Определение проводили методом обращенно-фазной ВЭЖХ в режим изократического элюирования, при этом использовали следующее оборудование: высокоэффективный жидкостный хроматограф Agilent 1200 Series («Agilent Technologies», США), снабженный спектрофотометрическим детектором (УФ-детектор модель G1365D). Неподвижная фаза – хроматографическая колонка из нержавеющей стали (длина 25,0 см, диаметр 4,6 мм), заполненная октадецилсиликагелем зернением 5 мкм типа Luna 5u C18(2) (Phenomenex Inc, США). Подвижная фаза – ацетонитрил (HPLC for Gradient Analysis, CAS № 75-05-8, Fisher Scientific, США), содержащий 10% воды и 0,1% муравьиной кислоты – вода, содержащая 10% ацетонитрила и 0,1% муравьиной кислоты (50:50 по объему).

Условия для аналитических определений: скорость потока 1 мл/мин; температура термостата колонки – 27–32 °С; длины волны детектирования – 320 нм; объем пробы – 5 мкл, время анализа – 20 мин.

Содержание иммунакора $C_{22}H_{18}O_6$ в субстанции в процентах (X) в пересчете на безводное, свободное от остаточных органических растворителей вещество, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot (-W)},$$

где S – площадь пика иммунакора на хроматограмме стандартного раствора, мАУ.мин; S_0 – площадь пика иммунакора на хроматограмме испытуемого раствора, мАУ.мин; a_0 – навеска стандартного образца иммунакора, г; a – навеска субстанции, г; P – содержание $C_{22}H_{18}O_6$ в стандартном образце, %; W – суммарное содержание воды и остаточных органических растворителей в субстанции, %

Количественное определение методом УФ-спектрофотометрии:

Около 0,025 г (точная навеска) стандартного образца и субстанции помещают в отдельные мерные колбы вместимостью 50 мл, растворяют в 50 мл ДМФА при нагревании, охлаждают и доводят объем раствора до метки и перемешивают. 0,4 мл полученного раствора переносят в отдельные мерные колбы вместимостью 25 мл, доводят объем раствора этанолом 96% до метки и перемешивают.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора и стандартного раствора на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ СПЕКТР», Россия) в максимуме поглощения при длине волны 320 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Содержание иммунакора $C_{22}H_{18}O_6$ в субстанции в процентах (X) в пересчете на безводное, свободное от остаточных органических растворителей вещество, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность стандартного раствора; a_0 – навеска стандартного образца иммунакора, г; a – навеска субстанции, г; P – содержание $C_{22}H_{18}O_6$ в стандартном образце, %; W – суммарное содержание воды и остаточных органических растворителей в субстанции, %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении статистической обработки результатов в соответствии с ОФС «Статистическая обработка результатов эксперимента» (ГФ XIV ОФС.1.1.0013.15) и типовым руководством [6, 7]. Методика была валидирована в соответствии с ОФС «Валидация аналитических методик» (ГФ XIV ОФС.1.1.0012.15) по показателям специфичности, линейности, правильности, прицезионности [6].

Специфичность метода УФ-спектрофотометрии была доказана по совпадению максимумов ($320 \pm 2,0$ нм) и минимумов ($262 \pm 2,0$ нм) спектров испытуемого раствора и стандартного раствора (рисунок 1), а также отсутствие влияния примеси и растворителя на результаты анализа.

Доказательство специфичности методом ВЭЖХ основано на данных анализа хроматограммы модельных

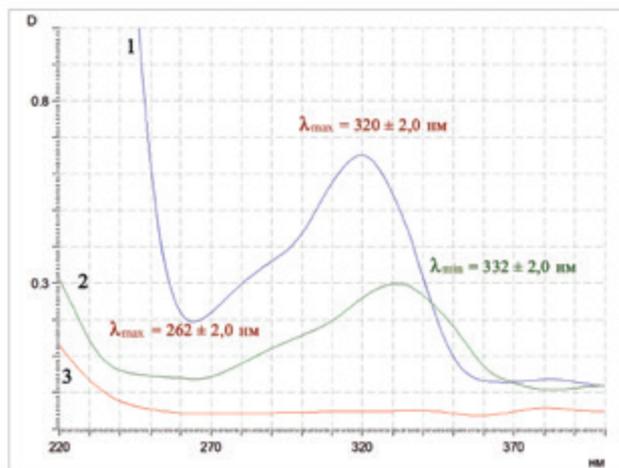


Рисунок 1. УФ-спектры: 1 – СО иммунакор (8,128 мкг/мл); 2 – СО примеси 4-Ме-БЭК (8,128 мкг/мл); 3 – растворители

Figure 1. UV-spectra: 1 – WITH Immunacor (8,128 µg/ml); 2 – CO impurities 4-Me-BEC (8,128 µg/ml); 3 – solvents

смесей известного состава (иммунакора и его примеси – 7-(2-бромэтокси)-4-метил-кумарина (4-Ме-БЭК) с концентрацией 25 мкг/мл, индивидуальных веществ и используемого растворителя (рисунки 2–4).

При этом установлено, что время удерживания иммунакора составляет 10,65 мин, 4-Ме-БЭК – 8,87 мин и как видно из рисунков 1–3, на хроматограмме пики определяемых веществ и примеси хорошо разделены между собой, пики примесей из растворителя не мешают определению иммунакора в субстанции.

В соответствии с полученными результатами нами установлено, что специфичность разработанных методик подтверждена.

Пригодность хроматографической системы при спектрофотометрическом определении оценивали путем многократном анализе СО иммунакора. При этом установлено что, относительное стандартное отклонение среднего результата определения (коэффициент вариации) от истинного значения RSD (n=6) не превышает 2,0% (0,44%).

Пригодность хроматографической системы при определении действующего вещества в субстанции методом ВЭЖХ оценивали путем последовательного шестикратного хроматографирования стандартного раствора и регистрации хроматограмм (рисунок 4).

Хроматографическая система является пригодной, так как достигается критерия приемлемости пригодности хроматографической системы, предусмотренные проектом НД: относительное стандартное

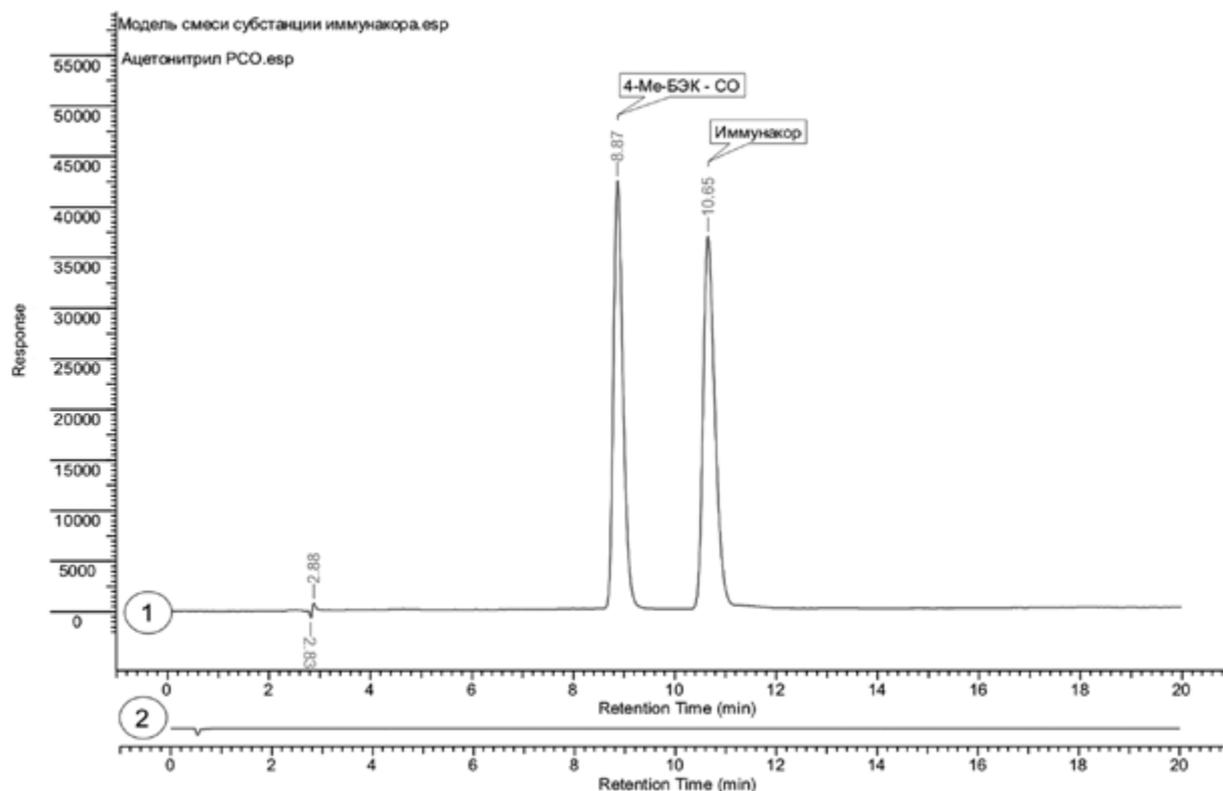


Рисунок 2. ВЭЖХ-хроматограмма модельной смеси (1) и растворителя (2)

Figure 2. HPLC chromatogram of the model mixture (1) and solvent (2)

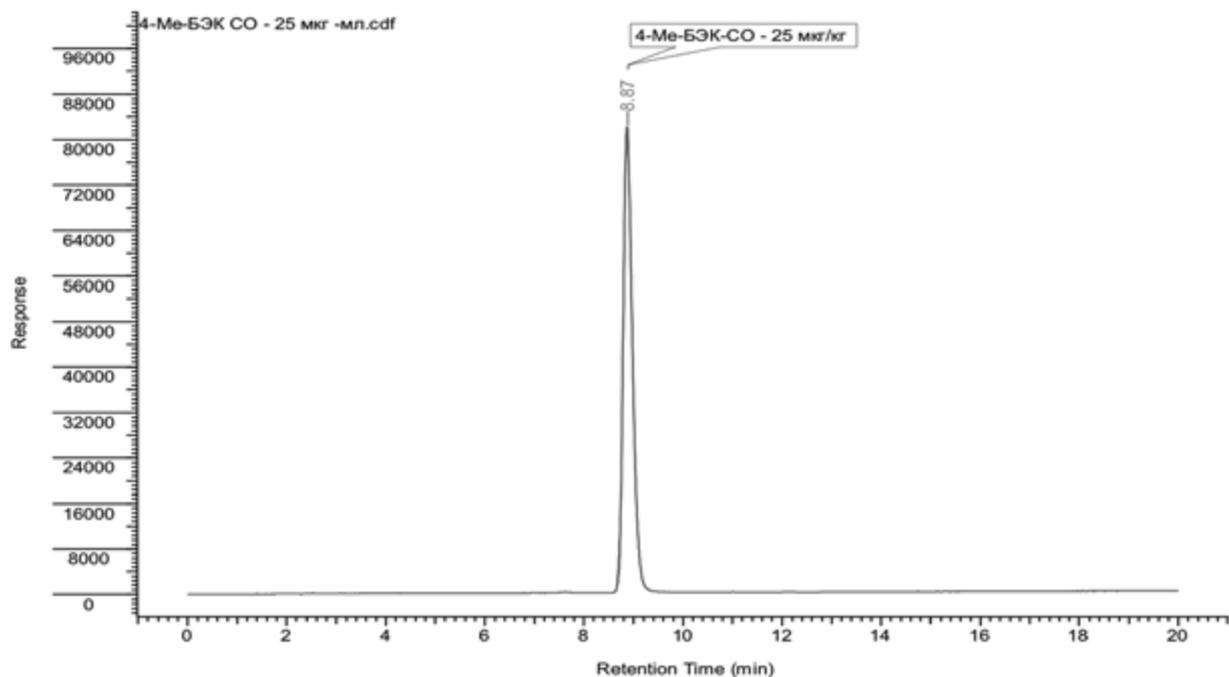


Рисунок 3. ВЭЖХ-хроматограмма СО 4-Ме-БЭК (25 мкг/мл)

Figure 3. HPLC chromatogram of CO 4-Me-BEC (25 µg/ml)

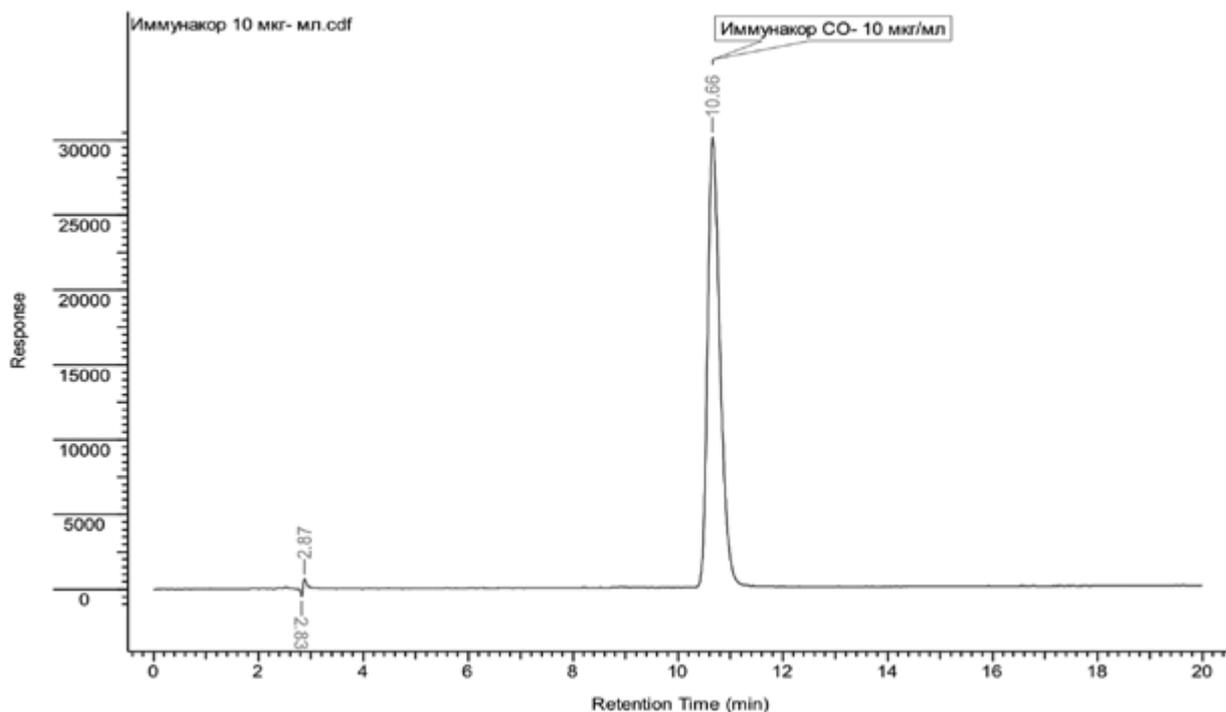


Рисунок 4. ВЭЖХ-хроматограмма СО иммунакора (10 мкг/мл)

Figure 4. HPLC chromatogram of the immunocorus CO (10 µg/ml)

отклонение значений площади пика соединения при многократном анализе раствора – 0,40 (не превышает 2,0 %); фактор удерживания соединения – 2,715 (более 2,0); эффективность колонки (N), определенная по пика соединения – 9897,361 теоретических тарелок (бо-

лее 5000); асимметрия (Т) пика соединения – 1,362 (не превышает 1,5) (таблица 1).

Линейность методики исследовали на 9 модельных смесей с содержанием исследуемого вещества от 80 до 120% от номинального значения (рисунки 5,

Таблица 1. Рассчитанные параметры пригодности роматографической системы

Table 1. Calculated suitability parameters chromatographic system

Соединение	RT, мин	k	T	N	RSD ₁ , %	RSD ₂ , %
Иммунакор	10,662±0,005	2,715±0,002	1,362±0,003	9897,361±54,446	0,40	0,44
Критерии приемлемости		не менее 2,0	не более 1,5	не менее 5000	не более 2,0 %	не более 2,0 %

Примечание: RSD₁ – метод УФ-спектрофотометрии; RSD₂ – метод ВЭЖХ.

Note: RSD₁ is a UV spectrophotometry method; RSD₂ – HPLC method.

б). Значение коэффициента корреляции составляет 0,9967 (более 0,9950) при $y_1 = 0,0892x - 0,0544$ для метода УФ-спектрофотометрии; для метода ВЭЖХ составляет 0,9994 (более 0,9950) при $y_2 = 0,3798x + 0,0244$, где y_1, y_2 – оптическая плотность и площадь пика, соответственно, x – концентрация (мкг/мл).

Диапазон экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели, в интервале concentra-

ций от 80 до 120% можно рассматривать как *аналитическую область методики*.

Оценку правильности методики подтвердили результатами анализа модельных растворов, представленных в таблице 2.

Таблица 2. Результаты определения правильности методик количественного определения иммунакора в субстанции

Table 2. The results of determining the correctness of methods for quantitative determination of immunocor in substance

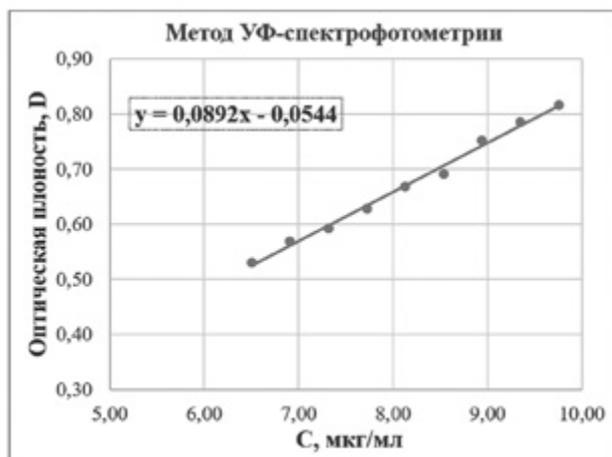


Рисунок 5. График линейной зависимости оптической плотности (D) от концентрации (C) раствора иммунакора

Figure 5. Graph of linear dependence of optical density (D) on concentration (C) of immunocoric solution

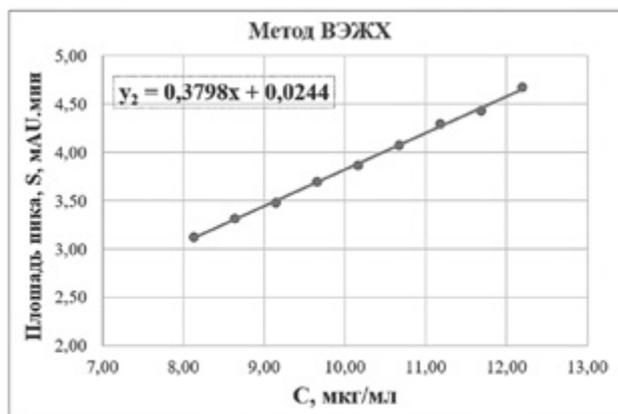


Рисунок 6. График линейной зависимости площади пика (S) от концентрации (C) раствора иммунакора

Figure 6. Graph of the linear dependence of the peak area (S) on the concentration (C) of the immunocoric solution

Взято, мкг/мл (c ₁)	Найдено, мкг/мл (c ₂)	Абсолютная ошибка, мкг/мл (d=c ₂ -c ₁)	Относительная ошибка, % (Y= dx 100/c ₁)	Найдено, %	Метрологические характеристики (P=95%, n=9)
Метод УФ-спектрофотометрии					
6,502	6,467	-0,035	-0,54	99,46	$\bar{x}=100,38\%$ $S=1,55$ $S\bar{x}=0,52$ $\Delta\bar{x}=1,19$ $\Delta x=3,58$ $RSD=1,55\%$ $\bar{\epsilon}=1,19\%$
6,909	6,930	0,022	0,31	100,31	
7,315	7,222	-0,094	-1,28	98,72	
7,722	7,655	-0,066	-0,86	99,14	
8,128	8,139	0,011	-0,13	100,13	
8,534	8,424	-0,110	-1,29	98,71	
8,941	9,167	0,227	2,53	102,53	
9,347	9,575	0,228	2,44	102,44	
9,754	9,942	0,189	-1,93	101,93	
Метод ВЭЖХ					
8,128	8,208	0,080	0,981	100,98	$\bar{x}=100,41\%$ $S=0,49$ $S\bar{x}=0,16$ $\Delta\bar{x}=0,37$ $\Delta x=1,12$ $RSD=0,48\%$ $\bar{\epsilon}=0,37\%$
8,636	8,704	0,068	0,789	100,79	
9,144	9,142	-0,002	-0,019	99,98	
9,652	9,695	0,043	0,446	100,45	
10,160	10,148	-0,012	-0,114	99,89	
10,668	10,691	0,023	0,218	100,22	
11,176	11,281	0,105	0,941	100,94	
11,684	11,647	-0,037	-0,316	99,68	
12,190	12,284	0,092	0,755	100,75	

При проведении исследования установлено, что в обеих методиках: относительное стандартное отклонение среднего результата определения (коэффициент вариации) от истинного значения RSD (n=9) не превышает 2,0%; относительные погрешности среднего результата ($\bar{\epsilon}$) – менее 2,0%, следовательно, правильность разработанных методик подтверждена.

С целью определения **сходимости методик** количественного определения исследуемого вещества в субстанции были приготовлены и проанализированы 3 модельных смесей с содержанием (80%, 100%, 120%) от номинального значения (рисунок 7). Статистический анализ результатов приведен в таблице 3.

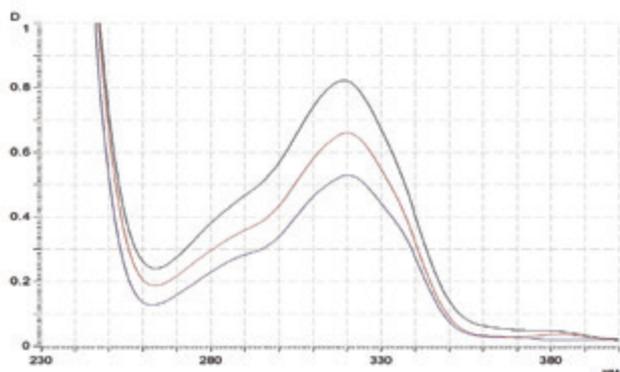


Рисунок 7. УФ-спектры субстанции иммунакора в интервале концентраций от 80 до 120% от номинального значения

Figure 7. UV spectra of the immunocor substance in the concentration range from 80 to 120% of the nominal value

Полученные результаты (таблицы 3, 4), показали, что сходимость количественного определения соединения в субстанции подтверждена, так как: коэффициент вариации не превышает 2%; относительные погрешности среднего результата ($\bar{\epsilon}$) – менее 2,0%; полуширина доверительного интервала среднего результата $\Delta\bar{x}$ составляет 1,02 и 0,36% для метода УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ, соответственно (не превышает максимально допустимую неопределенность результатов анализа для субстанции $\Delta_{As}=2\%$).

Сравнение значений вычисленных критериев Фишера $F_{\text{выч.}}$ с табличными $F(P, f_1, f_2)$, найденными при $p=95\%$, показало, что различие значений S_1^2 и S_2^2 значимо, так как описывается неравенством $F_{\text{выч.}}=7,61 > F_{\text{табл.}}=3,44$. Следовательно, оба метода дают воспроизводимые результаты, но воспроизводимость метода ВЭЖХ в 3 раза выше, чем в методе УФ-спектрофотометрии.

Оценка внутрилабораторной прецизионности при анализе субстанции с полным повторением процедуры приготовления проб в условиях сходимости, выполнялась в разные дни. Внутрилабораторная прецизионность (таблицы 3, 4) определения соединения в субстанции подтверждена на основании результатов анализа: относительные погрешности среднего результата ($\bar{\epsilon}$) не превышает 2%; коэффициент вариации составляет 1,89 и 0,70% для метода УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ, соответственно (не превышает 2%).

Таблица 3. Оценка сходимости и внутрилабораторной прецизионности количественного определения соединения в субстанции методом УФ-спектрофотометрии

Table 3. Estimation of convergence and intralaboratory precision of quantitative determination of a compound in a substance by the method of UV spectrophotometry

Взято, мг/мл (c_1)	Найдено, мг/мл (c_2)	Абсолютная ошибка, мг/мл ($d=c_2-c_1$)	Относительная ошибка, % ($Y= dx 100/c_1$)	Найдено, %	Метрологические характеристики ($P=95\%$, $n=9$)
День 1					
6,502	6,596	0,094	1,447	101,45	$\bar{x}=99,88\%$ $S=1,32$ $S\bar{x}=0,44$ $\Delta\bar{x}=1,02$ $\Delta x=3,05$ $\bar{\epsilon}=1,02\%$ $S^2=1,75$
	6,415	-0,087	-1,345	98,65	
	6,431	-0,072	-1,102	98,90	
8,128	8,118	-0,010	-0,120	99,88	
	8,158	0,030	-0,375	100,37	
	8,023	-0,105	1,289	98,71	
9,754	9,930	0,176	1,809	101,81	
	9,583	-0,171	-1,751	98,25	
	9,845	0,091	-0,934	100,93	
День 2					
6,502	6,695	0,193	2,964	102,96	$\bar{x}=100,89\%$ $S=1,91$ $S\bar{x}=0,64$ $\Delta\bar{x}=1,47$ $\Delta x=4,41$ $RSD=1,89$ $\bar{\epsilon}=1,46\%$ $S^2=3,65$
	6,378	-0,124	-1,908	98,09	
	6,553	0,050	0,772	100,77	
8,128	8,277	0,149	1,829	101,83	
	8,292	0,164	-2,024	102,02	
	8,035	-0,093	1,139	98,86	
9,754	10,015	0,262	2,683	102,68	
	9,607	-0,146	-1,502	98,50	
	9,974	0,220	-2,259	102,26	
Критерий Стьюдента: $t_{\text{выч.}}=1,29 < t_{\text{табл.}}=2,31$					

Для оценки прецизионности метода количественного определения соединения в субстанции проведена совместная статистическая обработка результатов анализов, полученных при выполнении сходимости и внутрилабораторной прецизионности. Как показало исследование, критерия Стьюдента вычисленного не больше критерия Стьюдента табличного ($t_{\text{выч.}}=1,29$ (УФ-спектрофотометрия) и $0,58$ (ВЭЖХ) $< t_{\text{табл.}}=2,31$). Данные свидетельствуют о том, что разработанная методика обладает приемлемой степенью прецизионности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами были разработаны методики количественного определения субстанции 4,4'-диметил-7,7'-этилендиокси-2Н-1-добензопиран-2,2'-диона (иммунакора) методом ВЭЖХ и УФ-спектрофотометрии.

При помощи валидационной оценки установлено, что разработанные методики количественного определения действующего вещества в субстанции

являются правильными, прецизионными, специфичными и линейными в аналитической области. Однако воспроизводимость метода ВЭЖХ превосходит метод УФ-спектрофотометрии.

Таблица 4. Оценка сходимости и внутривлабораторной прецизионности количественного определения соединения в субстанции методом ВЭЖХ

Table 4. Assessment of convergence and intralaboratory precision quantification of compounds in substance by HPLC

Взято, мг/мл (c_1)	Найдено, мг/мл (c_2)	Абсолютная ошибка, мг/мл ($d=c_2 - c_1$)	Относительная ошибка, % ($Y= dx /c_1$)	Найдено, %	Метрологические характеристики ($P=95\%, n=9$)
День 1					
8,128	8,208	0,080	0,981	100,98	$\bar{x}=100,51\%$ $S=0,48$ $S\bar{x}=0,16$ $\Delta\bar{x}=0,37$ $\Delta x=1,10$ $RSD=0,47$ $\bar{\epsilon}=0,36\%$ $S^2=0,23$
	8,212	0,084	1,034	101,03	
	8,196	0,068	0,840	100,84	
10,160	10,140	-0,020	-0,194	99,81	
	10,148	-0,012	-0,114	99,89	
	10,167	0,007	0,065	100,06	
12,192	12,268	0,076	0,625	100,62	
	12,294	0,102	0,840	100,84	
	12,255	0,063	0,517	100,52	
День 2					
8,128	8,260	0,132	1,627	101,63	$\bar{x}=100,35\%$ $S=0,70$ $S\bar{x}=0,23$ $\Delta\bar{x}=0,54$ $\Delta x=1,62$ $RSD=0,70$ $\bar{\epsilon}=0,5\%$ $S^2=0,49$
	8,207	0,079	0,970	100,97	
	8,191	0,063	0,776	100,78	
10,160	10,135	-0,025	-0,246	99,75	
	10,141	-0,019	-0,191	99,81	
	10,156	-0,004	-0,039	99,96	
12,192	12,124	-0,068	-0,560	99,44	
	12,268	0,076	0,625	100,62	
	12,2104	0,018	0,151	100,15	
Критерий Стьюдента: $t_{\text{выч.}}=0,58 < t_{\text{табл.}}=2,31$					

ЛИТЕРАТУРА

- Абышев А. З., Журкович И. К., Ивкин Д. Ю., Нгуен К. Б. Синтез, физико-химический анализ и фармакологическая активность некоторых производных варфарина. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017; 2(19): 192–198.
- Абышев А. З., Нгуен К. Б. Синтетические ковалентно комбинированные производные 2H-1-бензопиран-2-она. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017; 4(21): 132–138.
- Абышев А. З., Нгуен К. Б., Ивкин Д. Ю., Нгуен Т. Х. Синтез и антиаритмическая активность новых гибридных молекул 1,4-дигидропиридина–кумарина. *Бутлеровские сообщения*. 2018; 1(53): 121–129.
- Патент RU 2242471. Производные 2H-1-бензопиран-2-она, проявляющие антикальциевую активность / А. З. Абышев, Э. М. Агаев; заявитель и патентообладатель Абышев Азад Зияд олгы. – Заявл. 31.07.2003; опубл. 20.12.2004.
- Абышев А. З., Агаев Э. М., Абулла-заде А. А. Природные и синтетические антигены (современное состояние и перспективы

создания новых иммунобиологических диагностических и лечебно-профилактических лекарственных препаратов). – Баку, ООО «Verje». 2007; 334 с.

- Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. 1. М.: ФЭМБ. 2018; 1814 с.
- Руководство для предприятий фармацевтической промышленности / методические рекомендации. М., Изд-во: Спорт и Культура – 2000. 2007; 192 с.

REFERENCES

- Abyshev A. Z., Zhurkovich I. K., Ivkin D. Ju., Nguen K. B. Synthesis, physico-chemical analysis and pharmacological activity of some warfarin derivatives. *Drug development & registration*. 2017; 2(19): 192–198 (In Russ.).
- Abyshev A. Z., Nguen K. B. Synthetic covalently combined 2H-1-benzopyran-2-one derivatives. *Drug development & registration*. 2017; 4(21): 132–138 (In Russ.).
- Abyshev A. Z., Nguen K. B., Ivkin D. Ju., Nguen T. H. Synthesis and antiarrhythmic activity of new hybrid molecules of 1,4-dihydropyridine – coumarin. *Butlerov Communications*. 2018; 1 (53): 121–129.
- Patent RU 2242471. Derivatives of 2H-1-benzopyran-2-one exhibiting anticalcium activity / A. Z. Abyshev, E. M. Agaev; applicant and patent owner Abyshev Azad Ziyad olgy – Appl. July 31, 2003; publ. 12.20.2004 (In Russ.).
- Abyshev A. Z., Agaev Je. M., Abulla-zade A. A. Natural and synthetic antigens (current state and prospects for the creation of new immunobiological diagnostic and therapeutic and prophylactic drugs). – Baku, LLC Verje. 2007; 334 p. (In Russ.).
- State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. V. 1. M.: FEMB. 2018; 1814 p. (In Russ.).
- Guide for enterprises of the pharmaceutical industry / guidelines. M., Publishing house: Sport and Culture – 2000. 2007; 192 p. (In Russ.).